

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 10 月 13 日 (13.10.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/095597 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12N 15/09, 15/88, 1/15, C12P 7/64

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/005786

(22) 国際出願日: 2005 年 3 月 28 日 (28.03.2005)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2004-107512 2004 年 3 月 31 日 (31.03.2004) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): サントリー株式会社 (SUNTORY LIMITED) [JP/JP]; 〒5308203 大阪府大阪市北区堂島浜 2 丁目 1 番 4 0 号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 落合 美佐 (OCHIAI, Misa). 河島 洋 (KAWASHIMA, Hiroshi). 清水 昌 (SHIMIZU, Sakayu). 櫻谷 英治 (SAKURADANI, Eiji).

(74) 代理人: 特許業務法人原謙三国際特許事務所 (HARAKENZO WORLD PATENT & TRADE-MARK); 〒5300041 大阪府大阪市北区天神橋 2 丁目北 2 番 6 号 大和南森町ビル Osaka (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF BREEDING LIPID-PRODUCING STRAIN AND UTILIZATION OF THE SAME

(54) 発明の名称: 脂質生産菌の育種方法およびその利用

(57) Abstract: A method of breeding a lipid-producing strain belonging to the genus *Mortierella*. According to the method of breeding a lipid-producing strain which involves an expression-inhibiting step of inhibiting the expression of a specific gene in the lipid-producing strain as described above, a lipid-producing strain belonging to the genus *Mortierella* can be efficiently and effectively bred.

(57) 要約: モルティエラ (*Mortierella*) 属に属する脂質生産菌の育種方法であって、上記脂質生産菌における特定の遺伝子の発現を抑制する発現抑制工程を含む脂質生産菌の育種方法によれば、モルティエラ属に属する脂質生産菌を効率的かつ有効に育種することができる。

WO 2005/095597 A1

明 細 書

脂質生産菌の育種方法およびその利用

技術分野

- [0001] 本発明は、脂質生産菌の育種方法およびその利用に関するものであり、特に、モルティエセラ(Mortierella)属に属する脂質生産菌において、形質転換による遺伝子発現抑制を行い、脂質生産菌を育種する方法およびその利用に関するものである。

背景技術

- [0002] 従来、微生物の代謝により有用な化合物を生産させる技術(広義の醗酵技術)が開発、実用化されている。具体的には、例えば、代謝によって脂質を大量に生産する能力を有する脂質生産菌を挙げることができる。代表的な脂質生産菌としては、*Mortierella alpina*(モルティエセラ アルピナ)等のモルティエセラ属の菌類を挙げることができる。これらモルティエセラ属の菌類は、アラキドン酸をはじめとする高度不飽和脂肪酸(PUFA)を生産することが知られており、工業的に特に有用な菌類である(例えば、特許文献1参照)。
- [0003] ところで、上記脂質生産菌等の微生物も含めて各種有用生物においては、育種、すなわち有用生物の遺伝的性質をより望ましい性質に改良する(品種改良する)ことがなされている。特に醗酵技術では、微生物による化合物の生産効率を向上し、当該化合物の製造コストを低減する等の観点から、育種は非常に重要なものとなっている。
- [0004] 育種方法は、基本的には、遺伝的変異を含む集団を作出する工程(便宜上、集団作出工程と称する)と、当該集団から望ましい性質を示す品種を選抜する工程(便宜上、選抜工程と称する)とからなっている。集団作出工程も選抜工程も育種しようとする有用生物の種類に応じて様々な方法を用いることができるが、上記脂質生産菌等の微生物では、集団作出工程において、主として(1)変異処理による方法と(2)形質転換による方法とが利用される。
- [0005] (1)変異処理による方法
- 変異処理により集団作出工程を行う場合、様々な手法で微生物に突然変異を生じ

させて集団を作出するが、突然変異そのものは無作為に多くの種類が生じることになる。そのため、その後の選抜工程にて、目的の形質を示す品種(株)を取得できたとしても、目的の形質に関わる遺伝子以外の他の遺伝子に予想外の損傷が生じている可能性が否めない。例えば、上記脂質生産菌の場合では、生産される脂質の種類に変化が生じて、増殖や胞子形成能などが悪くなること等があり得る。したがって、変異処理による集団作出工程では、必ずしも生産性のよい株を得ることができるとは限らない。

[0006] さらに、この方法では、上記のように、得られる集団を形成する個体には、無作為に多くの種類の突然変異が生じていることになる。それゆえ、その後の選抜工程において、目的の性質を示す突然変異体(株)を得るために、適切な選抜方法(スクリーニング方法)がない場合には、上記集団を形成する個体全てについて突然変異の種類を調べる必要があり、膨大な労力を必要とする。

[0007] (2) 形質転換による方法

これに対して、形質転換により集団作出工程を行う場合、育種しようとする有用生物を宿主として、目的の性質を獲得するために必要なDNA断片を導入(形質転換)することにより形質転換体の集団を得る。すなわち、目的に合わせた特定の遺伝子のみを発現制御した集団を作出することになる。そのため、その後の選抜工程では、得られた形質転換体の中からより望ましい品種(株)のみを選抜すればよいことになるので、スクリーニングが容易になるだけでなく、上記他の遺伝子に予想外の損傷が生じることも回避できる。したがって、育種にかかる労力を著しく低減することができる。

[0008] このように、育種における集団作出工程では、形質転換による方法が好ましく用いられている。例えば、モルティエラ属の菌類が属する糸状菌の形質転換方法については、多くの技術が報告されている。

[0009] 具体的には、(a)非特許文献1～3等には、*Aspergillus nidulans* や *Neurospora crassa* 等の糸状菌をパーティクルデリバリー法により形質転換する技術が開示されている。これら技術では、形質転換する宿主株としてウラシル要求性株を用いるとともに、それを相補する遺伝子をマーカー遺伝子として用い、形質転換株を選択している。

[0010] また、(b)上記 *M. alpina* の形質転換方法としては、非特許文献4に開示されている

技術が知られている。この技術では、胞子をプロトプラスト化し、エレクトロポレーション法によって遺伝子を細胞内に導入している。また、形質転換体のスクリーニングには、マーカー遺伝子として大腸菌由来のハイグロマイシンB耐性遺伝子(hpt)を用いている。これにより、ハイグロマイシン含有培地で生育できるものを形質転換体として選択することができる。

[0011] また、有用生物の遺伝的性質をより望ましい性質に改良する際、特定の遺伝子の機能を低下させたり、または特定の遺伝子の機能を欠失させたりする場合も存在する。このような場合、上記(1)の変異処理による方法でも特定の遺伝子の機能を低下または欠失させた変異株を取得することができるが、この変異処理による方法では上述の不利益が存在する。このため、上記(2)の形質転換による方法を用いて、より簡便かつ確実に、特定の遺伝子の機能を低下させたり、もしくは特定の遺伝子の機能を欠失させたりした変異株を育種する技術の開発が望まれている。

[0012] ここで、上記のような特定の遺伝子の機能を低下させたり、もしくは特定の遺伝子の機能を欠失させたりした変異株を得る技術として、特定の遺伝子の発現を抑制する技術が知られている。これらの技術には、例えば、RNAi法、相同組換えによる染色体上の遺伝子を欠失させる方法、コサプレッション法、アンチセンス法などが知られている。特に、相同組換えによる方法はその効果が安定的であることが知られており、またRNAi法は、近年になって知られたものであるが、多くの生物で報告され始めており、その効果も極めて良好であることが知られている。

[特許文献1]

特公平7-34752(公告日:平成7(1995)年4月19日、公開公報:特開昭63-44891、公開日:昭和63(1988)年2月25日)

[非特許文献1]

Fungaro M. H. et al. Fems microbial Lett., 25, 293-297, 1995

[非特許文献2]

Herzog R. W. et al. Appl. Microbiol. Biotechnol., 45, 333-337, 1996

[非特許文献3]

Armaleo, D. et al. Curr. Genet., 17, 97-103, 1990

〔非特許文献4〕

Mackenzie D. A. et al. Appl. Environ. Microbiol., 66, 4655-4661, 2000

発明の開示

- [0013] しかしながら、脂質生産菌であるモルティエセラ属の菌類において、特定の遺伝子の発現を抑制する遺伝子発現の抑制方法については、一切報告されていない。
- [0014] また例えば、上述のRNAi法は、多くの生物において遺伝子発現抑制が報告されているが、特定の生物においてRNAi法が有効か否かは実際に試してみなければ明らかではない。例えば、脂質生産菌であるモルティエセラ属の菌類では、RNAi法が有効であるといった報告は一切されていない。
- [0015] PUFAの多くは必須脂肪酸であり、生体内で複雑な生理機能に関与するため、近年重要な栄養素として注目されている。それゆえ、より一層効率的にPUFAを生産する醗酵技術が求められているが、そのためには、脂質生産菌として信頼性の高いモルティエセラ属の菌類を効率的かつ有効に育種する技術が必要となる。
- [0016] 本発明は、上記の課題に鑑みてなされたものであり、その目的は、特定の遺伝子の発現を抑制し、モルティエセラ属に属する脂質生産菌の育種を有効かつ効率的に行うことができる育種方法およびその利用を提供することにある。
- [0017] 本発明者は、上記課題に鑑み鋭意検討した結果、RNAi法によって、MAELO遺伝子または $\Delta 12$ 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子の発現を抑制したモルティエセラ属の変異株を取得しその機能解析を行ったところ、該変異株がそれぞれ超長鎖不飽和脂肪酸の割合が減少した菌株、またはミード酸を生産する菌株であることを見出し、本発明を完成させるに至った。
- [0018] すなわち、本発明は産業上有用な方法または物質として、下記1)～15)の発明を含むものである。
- [0019] 1)モルティエセラ(Mortierella)属に属する脂質生産菌の育種方法であって、上記脂質生産菌における特定の遺伝子の発現を抑制する発現抑制工程を含む脂質生産菌の育種方法。
- [0020] 2)上記発現抑制工程は、特定の遺伝子の発現をRNAi法により抑制するRNAi工程を含む1)に記載の脂質生産菌の育種方法。

- [0021] 3) 上記RNAi工程は、上記脂質生産菌に、上記特定の遺伝子が有する塩基配列の全体または一部に対応する2本鎖RNAを発現する組換え発現ベクターを導入する形質転換工程を含む2)に記載の脂質生産菌の育種方法。
- [0022] 4) 上記RNAi工程は、さらに、上記組換え発現ベクターを構築する発現ベクター構築工程を含む3)に記載の脂質生産菌の育種方法。
- [0023] 5) 上記形質転換工程では、エレクトロポレーション法、またはパーティクルデリバリー法が用いられる3)または4)に記載の脂質生産菌の育種方法。
- [0024] 6) 上記脂質生産菌は、モルティエラ アルピナ (*Mortierella alpina*)である1)～5)のいずれかに記載の脂質生産菌の育種方法。
- [0025] 7) 上記特定の遺伝子は、脂質代謝遺伝子である1)～6)のいずれかに記載の脂質生産菌の育種方法。
- [0026] 8) 上記脂質代謝遺伝子は、脂肪酸代謝遺伝子である7)に記載の脂質生産菌の育種方法。
- [0027] 9) 上記脂肪酸代謝遺伝子は、脂肪酸鎖長延長酵素または脂肪酸不飽和化酵素をコードする遺伝子である8)に記載の脂質生産菌の育種方法。
- [0028] 10) 上記脂肪酸鎖長延長酵素をコードする遺伝子は、GLELO遺伝子またはMAELO遺伝子である9)に記載の脂質生産菌の育種方法。
- [0029] 11) 上記脂肪酸不飽和化酵素をコードする遺伝子は、 $\Delta 5$ 脂肪酸不飽和化酵素、 $\Delta 6$ 脂肪酸不飽和化酵素、 $\Delta 8$ 脂肪酸不飽和化酵素、 $\Delta 9$ 脂肪酸不飽和化酵素、 $\Delta 12$ 脂肪酸不飽和化酵素、 $\Delta 15$ 脂肪酸不飽和化酵素、 $\Delta 17$ 脂肪酸不飽和化酵素、 $\omega 3$ 脂肪酸不飽和化酵素から選ばれる1つの酵素をコードする遺伝子である9)に記載の脂質生産菌の育種方法。
- [0030] 12) 上記1)～11)のいずれかに記載の脂質生産菌の育種方法を実施するための育種キット。
- [0031] 13) 上記育種キットは、以下の(a)～(d)のうち、少なくとも1つの物質を含む12)に記載の育種キット。
- (a) 上記特定の遺伝子が有する塩基配列の全体または一部に相当する2本鎖RNAを発現する組換え発現ベクター。

(b) (a) の組換え発現ベクターを構築するための試薬類。

(c) (a) の組換え発現ベクターを脂質生産菌に導入するための試薬類。

(d) 脂質生産菌及び／又は(a)の組換え発現ベクターが導入された形質転換株を培養するための試薬類。

[0032] 14) 上記1)～13)のいずれかに記載の脂質生産菌の育種方法または育種キットによって得られる脂質生産菌。

[0033] 15) 上記14)に記載の脂質生産菌からPUFA含有脂質を生産する脂質の生産方法。

発明を実施するための最良の形態

[0034] 本発明の一実施形態について説明すると以下の通りであるが、本発明はこれに限定されるものではない。

[0035] 本発明では、特定の遺伝子、特に脂質代謝に関与する遺伝子の発現を抑制する発現抑制工程を実施することによって、所望の性質(形質)を有する脂質生産菌を育種する方法とこの育種方法の利用法を提供する。

[0036] 以下、本発明の対象となるモルティエラ属の菌類、本発明に係る育種方法、およびその利用について、それぞれ詳細に説明する。

[0037] [1]モルティエラ属の菌類

本発明に係る育種方法の対象となるモルティエラ属の菌類としては、特に限定されるものではなく、モルティエラ属に分類される各種糸状菌を挙げることができる。モルティエラ属は、MortierellaとMicromucorとの2亜属に分けられる。Mortierella亜属の菌は全て、アラキドン酸等の炭素数20の脂肪酸を生産するが、Micromucor亜属は炭素数18以下の脂肪酸しか生産しない。本発明の対象となるモルティエラ属の菌類は上記2亜属の何れであってもよい。

[0038] モルティエラ属の菌類としては、具体的には、*M. alpina*, *M. elongata*, *M. exigua*, *M. hygrophila*, *M. isabellina*, *M. turficola*, *M. gamsii*, *M. cogitans*, *M. capitata*, *M. vinacea*等が知られているが、もちろんこれらに限定されるものではない。中でも、本発明では、脂質生産菌として広く用いられている *M. alpina* (モルティエラ アルピナ)を好ましく用いることができる。*M. alpina* は、アラキドン酸(ARA)を始めとしたPU

FAを菌体内に蓄積する株が知られており、PUFAの生合成研究用だけではなくPUFAを生産する工業用にも広く用いられている。

[0039] 上記*M. alpina*を含むモルティエセラ属の菌類の入手方法は特に限定されるものではなく、財団法人醗酵研究所やATCC (American Type Culture Collection) 等の微生物等寄託機関から入手すればよい。あるいは、特許出願されている株の場合であれば、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターから入手することができる。また、自然環境からモルティエセラ属に属する未知の株を、公知のスクリーニング方法により取得して用いてもよい。

[0040] [2]本発明に係る脂質生産菌の育種方法

本発明に係る育種方法は、上記発現抑制工程を含むものであればよく、その他の工程、材料、条件等は、特に限定されるものではない。ここでいう「発現抑制工程」とは、脂質生産菌における特定の遺伝子の発現を抑制する工程であればよく、その具体的な手法等は従来公知の方法を利用でき、特に限定されるものではない。例えば、相同組換えによる染色体上の遺伝子を欠失させる方法、コサプレクション法、アンチセンス法、RNAi法などを用いることができよう。これらの中でも、RNAi法がその手法の簡便性や優れた効果等の理由から特に好ましい。

[0041] つまり、発現抑制工程は、RNAi法を利用して、特定の遺伝子の発現を抑制するRNAi工程を含むことが好ましいといえる。具体的には、脂質生産菌であるモルティエセラ属の菌類に対して、RNAiを引き起こすようなDNA断片を導入することで、2本鎖RNAを発現させ、特定の遺伝子の発現を抑制し、所望の性質を有する脂質生産菌を育種する。

[0042] さらに、本RNAi工程は、形質転換工程、発現ベクター構築工程を含んでいることが好ましい。なお、本発明に係る脂質生産菌の育種方法は、もちろん他の工程を含んでいてもよいことはいうまでもない。以下、発現抑制工程に含まれる各工程について詳細に説明する。

[0043] [2-1]RNAi工程

本発明において行われるRNAi工程は、脂質生産菌における特定の遺伝子の発現を、RNAi法により抑制する工程であればよく、その他の具体的な方法、条件、材

料等は特に限定されるものではない。

[0044] ここでいう「RNAi法」とは、RNAiの現象を利用して遺伝子の発現を抑制する方法のことをいう。「RNAiの現象」とは、2本鎖RNA(以下、dsRNAと称する場合もある)が細胞内に存在すると、このRNAとハイブリダイズするmRNAの分解が促進され、その結果、該mRNAに対応する遺伝子の発現が抑制される現象である。

[0045] すなわち、本RNAi工程では、脂質生産菌の細胞内に、発現を抑制したい任意の遺伝子の全部あるいはその一部分をコードする塩基配列に相補的なdsRNAを導入する工程であればよいともいえる。導入するRNAの塩基配列や鎖長などは特に限定されるものではなく、所望の遺伝子の発現を抑制できるように、適宜設定可能である。この際、従来公知のRNAi法の技術が好適に利用可能であろう。

[0046] また、RNAを脂質生産菌に導入する方法も特に限定されるものではなく、従来公知のRNAi法を利用可能である。細胞へのdsRNAの導入法の具体例としては、後述するように実施例に示すように、RNAiを引き起こすRNAをコードするプラスミドDNA(組換え発現ベクター)を細胞に導入し、細胞内で発現させ、遺伝子を抑制する方法が利用可能である。この他にも、リポソーム法、電気穿孔法、マイクロインジェクション(微量注入)などが挙げられる。つまり、本RNAi工程には、下記の発現ベクター工程、形質転換工程が含まれていることが好ましい。

[0047] [2-1-1] 発現ベクター構築工程

本発明において行われる発現ベクター構築工程は、モルティエラ属の菌類(脂質生産菌)において、発現を抑制したい所定の遺伝子が有する塩基配列の全体または一部に相当する2本鎖RNAを発現する組換え発現ベクターを構築する工程であればよい。すなわち、モルティエラ属の菌類において、RNAiを引き起こす2本鎖RNAが発現されるように、プロモーターの支配下に相当な配列のDNAを連結した組換え発現ベクターを構築する工程であれば特に限定されるものではない。つまり、プロモーターによって上記2本鎖RNAをコードする遺伝子が発現するように組換え発現ベクターを構築する工程ともいえる。

[0048] 「発現を抑制したい遺伝子」としては、モルティエラ属の菌類(脂質生産菌)が有する任意の遺伝子であればよく、その種類は目的に応じて適宜選択することができよ

う。この発現を抑制したい遺伝子については、下記の〔2-1-2〕欄の形質転換工程において説明する。

[0049] RNAiを実施するために組換え発現ベクターを構築するための方法としては、従来公知の方法を用いることができ、特に限定されるものではない。例えば、発現を抑制したい遺伝子のセンス鎖とアンチセンス鎖とが転写されるようにリンカー配列等を介して接続した遺伝子カセットを宿主細胞内でin vivo 転写させ、分子内で2本鎖を形成するようなRNA (inverted repeat RNA)を生成させることによって、当該RNAに相当する宿主遺伝子の発現を抑制する方法が挙げられる。この方法によれば、継続的に細胞においてRNAiを発生させることができ、その結果としてより持続的に標的遺伝子の発現を抑制することができる。なお、リンカー配列は設けても設けなくてもよいが、設ける方が好ましい。

[0050] 具体的には、例えば、宿主細胞内で発現可能なプロモーター下流に、任意の遺伝子の逆向きcDNA、リンカー配列、該任意の遺伝子の順向きcDNAを順に挿入したコンストラクト(RNAiプラスミド)を作製する。そして、このRNAiプラスミドを脂質生産菌に導入して、in vivo 転写させることにより、分子内で2本鎖を形成するinverted repeat RNAを生成させることができよう。

[0051] なお、上記RNAiプラスミドに組み込まれるアンチセンス鎖の遺伝子とセンス鎖の遺伝子との並ぶ順序、向き等は、宿主内でin vivo 転写され生成されるRNAが、inverted repeat RNAとして分子内で2本鎖を形成するような順序、向き等であればよく、特に限定されるものではない。

[0052] また、かかる2本鎖RNAの塩基配列の鎖長としては、RNAiを効率的に引き起こすことができる程度の鎖長であればよく、特に限定されるものではない。また、遺伝子の一部分に対応する2本鎖RNAを用いる場合、どの部分を選択するかについては、その目的に応じて適宜選択可能である。

[0053] また、上記プロモーターは、モルティエラ属の菌類(脂質生産菌)において、上記2本鎖RNAをコードする遺伝子を有効に発現させることが可能なプロモーターであれば特に限定されるものではなく、公知のプロモーターを好適に用いることができる。例えば、hisH4. 1プロモーターを用いているがもちろんこれに限定されるものではない。

い。

- [0054] 上記組換え発現ベクターの母体となるベクターとしては、従来公知の種々のベクターを用いることができる。例えば、プラスミド、ファージ、またはコスミド等を用いることができ、導入する宿主細胞（モルティエラ属の菌類）や導入方法に応じて適宜選択することができる。具体的には、例えば、pBR322、pBR325、pUC系、pBluescript系、pBI系のベクター等を挙げることができる。
- [0055] 上記組換え発現ベクターは、上記プロモーターおよび上記2本鎖RNAをコードする遺伝子に加えて、さらに他のDNAセグメントを含んでいてもよい。当該他のDNAセグメントは特に限定されるものではないが、ターミネーター、選別マーカ、エンハンサー、翻訳効率を高めるための塩基配列等を挙げることができる。
- [0056] ターミネーターは転写終結部位としての機能を有していれば特に限定されるものではなく、公知のものであってもよい。上記組換え発現ベクターにおいては、ターミネーターを適当な位置に配置することにより、細胞に導入された後に、不必要に長い転写物を合成するような現象の発生を防止することができる。例えば、trpCターミネーターを用いているがもちろんこれに限定されるものではない。
- [0057] 上記選別マーカとしては、例えば、栄養要求性を相補する遺伝子や薬剤耐性遺伝子を用いることができる。上記栄養要求性を相補する遺伝子の具体的な一例としては、例えば、ロイシン、ヒスチジン、メチオニン、アルギニン、トリプトファン、リジン等のアミノ酸要求性を相補する遺伝子；ウラシル、アデニン等の核酸塩基要求性を相補する遺伝子；ビタミン要求性を相補する遺伝子；等を挙げることができる。これにより、上記特定の栄養素を欠失させた培地（特定の栄養素を含まない培地）中で生育する形質転換株を選択することによって、上記組換え発現ベクターが導入された形質転換株を容易に選別することができる。また、かかる薬剤耐性遺伝子の具体的な一例としては、例えば、アンピシリン、ハイグロマイシン、ブレオマイシン、カナマイシン、ゲンタマイシン、クロラムフェニコール等に対する薬剤耐性遺伝子を挙げることができる。これにより、上記抗生物質を含む培地中で生育する形質転換株を選択することによって、上記組換え発現ベクターが導入された形質転換株を容易に選別することができる。

- [0058] また、エンハンサーは、一本のデオキシリボ核酸(DNA)鎖上の、すなわちcisの位置にある、近傍の遺伝子の転写開始を促進するDNA上の塩基配列部分であればよい。例えば、サル由来のウイルスsimian virus 40(SV 40)の複製開始点の近くに存在する72塩基の反復配列をエンハンサーとして利用することができる。なお、これ以外にも、従来公知のエンハンサー配列を用いることができる。このようなエンハンサーを用いると、プロモーター領域のみでは所望の遺伝子の発現が弱い場合でも転写活性を高めることができる。このように、上記組換え発現ベクターには、その目的や導入する細胞等の種類に応じて、さまざまなDNAセグメントを含ませることができる。
- [0059] 上記組換え発現ベクターの構築方法についても特に限定されるものではなく、適宜選択された母体となるベクターに、上記プロモーター、上記2本鎖RNAをコードする遺伝子、および必要に応じて上記他のDNAセグメントを所定の順序となるように導入すればよい。例えば、上記2本鎖RNAをコードする遺伝子とプロモーターと(必要に応じてエンハンサー、ターミネーター等)とを連結して発現カセットを構築し、これをベクターに導入すればよい。
- [0060] 発現カセットの構築では、例えば、各DNAセグメントの切断部位を互いに相補的な突出末端としておき、ライゲーション酵素で反応させることで、当該DNAセグメントの順序を規定することが可能となる。なお、発現カセットにターミネーターが含まれる場合には、上流から、上記プロモーター、上記2本鎖RNAをコードする遺伝子、ターミネーターの順となっていればよい。さらに、発現カセットにエンハンサーが含まれる場合には、上流から、上記プロモーター、エンハンサー、上記2本鎖RNAをコードする遺伝子の順となっていればよい。また、組換え発現ベクターを構築するための試薬類、すなわち制限酵素やライゲーション酵素等の種類についても特に限定されるものではなく、市販のものを適宜選択して用いればよい。
- [0061] また、上記組換え発現ベクターの増幅(増殖)方法(生産方法)も特に限定されるものではなく、従来公知の方法を用いることができる。一般的には大腸菌を宿主として当該大腸菌内で増殖させればよい。このとき、ベクターの種類に応じて、好ましい大腸菌の種類を選択してもよい。
- [0062] [2-1-2]形質転換工程

本発明において行われる形質転換工程は、上記脂質生産菌に、上記特定の遺伝子が有する塩基配列の全体または一部に相当する2本鎖RNAを発現する組換え発現ベクターを導入する工程であればよく、その他の具体的な工程、条件、材料等は特に限定されるものではない。つまり、上記発現ベクター構築工程において構築した組換え発現ベクターを、上記脂質生産菌に導入(形質転換)する工程であればよい。

[0063] また、本工程を実施することにより、上記脂質生産菌において、発現を抑制したい所望の遺伝子の全体または一部分に対応する2本鎖RNAを大量に発現させることができる。このため形質転換された脂質生産菌では、RNAiが引き起こされ、該所望の遺伝子の発現が効率的に抑制されることになる。

[0064] このような「発現を抑制したい遺伝子」としては、上述のようにモルティエラ属の菌類(脂質生産菌)が有する任意の遺伝子であればよく、その種類は目的に応じて適宜選択することができる。例えば、モルティエラ属の菌類は脂質生産菌として用いられる場合が多いため、脂質代謝遺伝子(脂質代謝に関与する遺伝子)の発現をRNAiにより抑制することが好ましい。脂質代謝遺伝子のなかでも、脂肪酸代謝遺伝子がより好適であり、特に脂肪酸鎖長延長酵素または脂肪酸不飽和化酵素をコードする遺伝子が好ましい。ここで、「脂肪酸鎖長延長酵素」をコードする遺伝子としては、例えば、GLELO遺伝子(GB accession No. AF206662)やMAELO遺伝子(GB accession No. AF268031)が挙げられる。また「脂肪酸不飽和化酵素」をコードする遺伝子としては、例えば、 $\Delta 5$ 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子(GB accession No. AY464949、AF067654、AF054824)、 $\Delta 6$ 脂肪酸不飽和化酵素(GB accession No. AB070557、AB070556、AB070555、AF307940、AF110510、AB020032)、 $\Delta 8$ 脂肪酸不飽和化酵素、 $\Delta 9$ 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子(GB accession No. AJ278339、AF085500、Y18554、Y18553、AB015612、AB015611)、 $\Delta 12$ 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子(GB accession No. AF417244、AF110509、AB020033、Eur. J. Biochem. 261, 812-820 (1999))、 $\Delta 15$ 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子、 $\Delta 17$ 脂肪酸不飽和化酵素、 $\omega 3$ 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子などが挙げられる。このような脂質代謝に関与する遺伝子の発現を抑制し、所望の脂質の生産量を増加させたり、あるいは減少させたりすることができるためである。また、生産する脂質の種類を改変したり、脂質の組成を

改変したりすることもできよう。

[0065] このような脂質代謝に関与する遺伝子として、例えば、後述する実施例では、MAELO遺伝子や、 $\Delta 12$ 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子を用いている。

[0066] MAELO遺伝子は、 γ -リノレン酸(GLA, $18:0n-6$)に作用して、ジホモ- γ -リノレン酸(DGLA, $20:3n-6$)を生成する活性をわずかながら有することが知られている(特表2002-523098号公報参照)。ただし、この反応に主として寄与していると考えられる遺伝子としてGLELO遺伝子が単離されている。このため、MAELO遺伝子には別の機能が存在すると考えられる。一方、GenBankのアノテーションとして、飽和脂肪酸や1価不飽和脂肪酸の鎖長延長反応を触媒するとされている。しかしながら、モルティエラ属の菌類(脂質生産菌)、特に、*M. alpina* (モルティエラアルピナ)において、MAELO遺伝子がどのような機能を有しているのかについては、一切明らかとなっていなかった。このため、*M. alpina* におけるMAELO遺伝子の機能を解析することが求められていた。

[0067] そこで、本発明者は、後述する実施例に示すように、酵母を用いて、*M. alpina* におけるMAELO遺伝子の機能を解析した。その結果、MAELO遺伝子は超長鎖飽和脂肪酸の鎖長延長反応を触媒することが示唆された。さらに、本発明者は、*M. alpina* において、RNAi法によりMAELO遺伝子の発現を抑制したところ、超長鎖飽和脂肪酸の脂質に占める割合が減少した菌株を取得できた。これらの結果は、*M. alpina* におけるMAELO遺伝子が超長鎖飽和脂肪酸の生合成系に関与していることをはじめて明らかとしたものである。

[0068] また、 $\Delta 12$ 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子は、オレイン酸($18:1$)をリノール酸($18:2$)に変換する反応を触媒する酵素をコードする遺伝子である。このため、後述の実施例に示すように、RNAi法により本遺伝子の発現を抑制すると、ミード酸等の $\omega 9$ 系の脂肪酸の割合が上昇した菌株(変異株)を取得することができる。

[0069] また、「発現を抑制したい遺伝子」が特定されていない場合でも、本発明を用いることができる。例えば、機能未知のESTの塩基配列のみが知られている場合、このESTに対応する2本鎖RNAをコードする発現ベクターを構築し、これを用いて形質転換株を得ることにより、該形質転換株の機能解析を通じて、そのESTを有する遺伝子の

機能を解析することもできるであろう。このように、本発明に係る育種方法により、機能未知の遺伝子の機能を推定することも可能である。

[0070] また、本形質転換工程で用いられる形質転換方法(遺伝子導入方法)も特に限定されるものではなく、エレクトロポレーション法、パーティクルデリバリー法等の従来公知の方法を好適に用いることができる。モルティエラ属の菌類では、エレクトロポレーション法を用いる場合、菌体をプロトプラスト化しておくことが好ましい。なお、上記パーティクルデリバリー法の具体的な一例としては、パーティクルガン法を挙げることができるが、もちろんこれに限定されるものではない。後述する実施例においては、パーティクルデリバリー法を用いて形質転換を行っている。

[0071] [2-2]その他の工程、その他の方法

本発明に係る育種方法においては、上記形質転換工程や、さらに上記組換え発現ベクター構築工程が含まれていてもよいが、さらに他の工程が含まれていてもよい。具体的には、形質転換後の脂質生産菌群から適切な形質転換株を選抜する選抜工程等を挙げることができる。

[0072] 選抜の方法は特に限定されるものではなく、形質転換株を培養・育成した後に、所定の遺伝的な形質を指標として選抜してもよい。つまり、選抜工程の具体的な手法は特に限定されるものではなく、育種の目的に応じて好ましい性質を示す形質転換株を選択できるような条件を設定し、公知の手法に基づいて好ましい形質転換株を選択すればよい。例えば、従来公知の栄養要求性マーカーや薬剤耐性マーカーを用いて選抜することができる。

[0073] なお、本発明の主題は、モルティエラ属の菌類(脂質生産菌)において、所定の遺伝子の発現を抑制し、所望の性質(形質)を有する新規株を育種する方法を提供することに存するのであって、本明細書中に具体的に記載した個々の形質転換操作、培養操作、および選抜操作に存するのではない。したがって、上記各操作以外の操作を用いた育種方法も本発明の範囲に属することに留意しなければならない。

[0074] [3]本発明の利用

[3-1]脂質生産菌(新品種)

本発明に係る脂質生産菌の育種方法は、上記のように、特定の遺伝子の発現を抑

制して、より望ましい性質(形質)を示す品種を取得するようになっている。それゆえ、モルティエセラ属に属する脂質生産菌を原種として、新規品種(新規株)を効率的かつ有効に生産することが可能となる。モルティエセラ属の菌は脂質生産菌として良く知られており、*M. alpina* のように信頼性の高いものも含まれているため、例えば、脂質生産性をより一層高めた株を容易かつ効率的に生産することが可能となる。

[0075] また、本発明に係る育種方法では、形質転換を行う脂質生産菌における任意の遺伝子の発現を抑制できる。それゆえ、本発明では、原種のモルティエセラ属の菌における、特定の遺伝子の発現を抑制することが可能となり、脂質生産量の増加、生産できる脂質の種類の改変、組成の改変等がなされた形質変換株(形質転換体)すなわち新規株を得ることができる。つまり、本発明には上記育種方法で作製した脂質生産菌が含まれる。

[0076] さらに、本発明では、原種のモルティエセラ属の菌から適当なDNA断片(cDNA断片、ESTなど)を取得して、これに対応する2本鎖RNAをコードする発現ベクターを用いてRNAiを引き起こすことにより、例えば、該DNA断片の全長遺伝子の発現を抑制した形質転換株を取得できる。この形質転換株を機能解析することにより、機能未知の遺伝子の機能を推定することが可能となるであろう。つまり、本発明は、機能未知の遺伝子の機能を推定する方法に応用可能である。

[0077] このように、本発明の育種方法によって得られる形質転換株は非常に有用なものであり、これら本発明の育種方法によって得られる形質転換株も本発明に属する。また、これ以外にも、本発明の利用として、例えば、本発明を実施するための育種キットが挙げられよう。以下、該育種キットについて説明する。

[0078] [3-2] 育種キット

本発明に係る育種キットは、上記[2]欄で説明した育種方法を実施するためのものであればよく、これに含まれる具体的な構成、材料、機器等は、特に限定されるものではない。具体的には、上記育種方法の各工程を実施するための物が含まれていればよい。

[0079] 例えば、上記形質転換工程を実施するために、(a) 上記特定の遺伝子が有する塩基配列の全体または一部に相当する2本鎖RNAを発現する組換え発現ベクターが

挙げられよう。また、上記発現ベクター構築工程を実施するためには、(b) (a)の組換え発現ベクターを構築するための試薬類が挙げられる。さらに、形質転換工程を実施するためには、(c) (a)の組換え発現ベクターを脂質生産菌に導入するための試薬類が挙げられよう。加えて、(d)脂質生産菌及び／又は(a)の組換え発現ベクターが導入された形質転換株を培養するための試薬類が含まれていてもよい。

[0080] 本明細書でいう「試薬類」とは、各種試薬や実験器具、機器等を含む意である。例えば、形質転換用の試薬類としては従来公知のものを利用でき、その具体的な構成は限定されるものではないが、例えば、形質転換の種類に応じた酵素やバッファー等を挙げることができる。その他、必要に応じてマイクロ遠心チューブ等の実験用素材を添付してもよいし、コンピテントセル作製用試薬や、ヒートブロック等の機器を含めることもできる。また、これら以外にも、例えば、発現ベクター構築工程を実施するための、各種材料(母体となるベクター、制限酵素等)や各種試薬や実験器具、検出機器等が挙げられる。

[0081] 上記の構成のような育種キットによれば、簡便かつ確実に本発明に係る育種方法を実施することができる。なお、本育種キットは、本発明に係る育種方法を実施するためのものであるから、本育種キットを用いて得られる脂質生産菌の新規品種も本発明に含まれることはいうまでもない。

[0082] [3-3]脂質の生産方法、および該生産方法によって得られる脂質

本発明に係る脂質の生産方法は、上述の[3-1]欄で説明した脂質生産菌からPUFA含有脂質を生産する方法であればよい。例えば、上記脂質生産菌を培養することにより、PUFA含有脂質を簡便に生産することができる。

[0083] 以下に、モルティエラ属の菌類が生産する脂質について説明する。

[0084] モルティエラ属の菌類が生産する有用生産物のひとつが、PUFAを含有する脂質であるが、PUFA生産性の高い野生株については、アラキドン酸を中心とする ω 6系PUFAを多量生成し、超長鎖飽和脂肪酸(VLSA)も副生することが知られている(Higashiyama K. et al. J. Am. Oil Chem. Soc., 75, 1501-1505, 1998)。ここでいう ω 6系PUFAとは、炭素数18以上で二重結合を2つ以上有し、末端メチル基炭素から数えて6番目の炭素に、末端メチル基側の最初の二重結合が存在する脂肪酸をいう

。モルティエセラ属の菌類に含まれる主な ω 6系PUFAとしては、リノール酸、 γ -リノレン酸、ジホモ- γ -リノレン酸、アラキドン酸などが挙げられる。

[0085] また、ここでいうVLSAとは、炭素数が20以上で二重結合を持たない飽和脂肪酸を言う。モルティエセラ属の菌類に含まれる主なVLSAとしては、エイコサン酸(アラキジン酸)、ドコサン酸(ベヘン酸)、テトラコサン酸(リグノセリン酸)、ヘキサコサン酸(セロチン酸)などが挙げられる。これらのVLSAは ω 6系PUFAの前駆体でもあるステアリン酸から生合成されるので、アラキドン酸をはじめとする ω 6系PUFAの生合成経路を中心に考えた場合、VLSA生合成経路はその副経路と考えることもできる。

[0086] また、飽和脂肪酸は、同じ炭素数の不飽和脂肪酸と比較して格段に融点が高い。一例として炭素数18の脂肪酸で比較すると、飽和脂肪酸であるステアリン酸の融点が69.6°Cであるのに対して、モノ不飽和脂肪酸であるオレイン酸の融点は13.4°C、ジ不飽和脂肪酸であるリノール酸の融点は-5.2°Cである。また、鎖長が長いほどさらに融点が高くなるために、VLSAの融点は非常に高い。ドコサン酸(ベヘン酸)、テトラコサン酸(リグノセリン酸)、ヘキサコサン酸(セロチン酸)の融点はそれぞれ、79.9°C、84.2°C、87.7°Cである。トリグリセリドなどの脂質の融点は、構成する脂肪酸の融点の影響を最も強く受けるために、VLSAを多く含む油脂の融点は一般的に高く、常温で固体であったり、低温で保管した際に析出により濁ったり固まったりすることがある。液状油になるように固体脂を分別除去する方法としては、ウインタリング法、乳化分別法などの工程が一般的に用いられている(「油脂・油糧ハンドブック」幸書房(1988)P261)。モルティエセラ属の菌類が生産する油脂中には、培養条件により変動するものの、数%のVLSAが含まれている。

[0087] しかしながら、上記脂質を、一般に食用に用いる場合には、低温条件も含めて安定して透明度の高い液状であることが好ましい場合が多い。このような脂質を得るために、上述のウインタリング法、乳化分別法などによって固体脂の分別除去は可能であるが、工程が複雑になってしまうために、製造に要する時間やコストが大きくなってしまふ。

[0088] さらに、脂質生合成の副経路であるVLSA生合成経路へ流れるために、目的のPUFAの生産性が上がりにくいという問題もある。

- [0089] また、PUFA生産性の高い野生株が生成するPUFAは、アラキドン酸を中心とする ω 6系PUFAがほとんどである。変異処理でさまざまな変異株が取得されており、生成するPUFAの種類が改変されたものも多数知られている。それらの変異株を解析することにより、例えば、 Δ 12不飽和化酵素活性を欠失または低下させることによりミード酸が蓄積すること、 Δ 5不飽和化酵素活性を欠失または低下させることによりジホモ- γ -リノレン酸が蓄積することなどが明らかとなっている。
- [0090] このように、変異処理によりPUFAの種類を改変することができるが、PUFAを生産する野生株の持つ遺伝子のうち、目的の形質に関わる遺伝子以外の遺伝子に損傷がない株を得ることができない。
- [0091] しかし、本発明に係る脂質の生産方法を用いることにより、上述の問題点を解決することができる。すなわち、本発明に係る脂質の生産方法によれば、固体脂になりやすいVLSA含有脂質の量を減らすことにより、ウインタリング法、乳化分別法などの時間やコストがかかる工程を入れることなく、食用に適した液状油を製造できる。
- [0092] また、副経路であるVLSA生合成経路へ流れることを抑制するために、目的のPUFAの生産性を上げることができる。加えて、目的の形質に関わる遺伝子以外の遺伝子に損傷がないPUFA生産株を得ることができる。
- [0093] また、本発明には、上述の脂質の生産方法によって生産される脂質も含まれる。かかる脂質としては、構成する全脂肪酸に占める ω 9系PUFAの割合が8%以上である脂質であることが好ましく、さらに好ましくは8.8%以上であり、より好ましくは9.4%以上である。
- [0094] また、ミード酸の割合が1.3%以上である脂質が好ましく、より好適には1.6%以上であることが好ましい。
- [0095] さらに、構成する全脂肪酸に占めるアラキドン酸の割合が10%以上、かつ超長鎖飽和脂肪酸の割合が0.1%以下である脂質が好ましい。また、アラキドン酸の割合が20%以上かつ超長鎖飽和脂肪酸の割合が0.1%以下である脂質がより好ましい。
- [0096] すなわち、本発明には、以下の脂質が含まれていてもよい。
- ・上記の脂質の生産方法によって生産された脂質であって、該脂質を構成する全脂

脂肪酸に占める ω 9系PUFAの割合が8%以上である脂質。

・上記の脂質の生産方法によって生産された脂質であって、該脂質を構成する全脂肪酸に占めるミード酸の割合が1. 3%以上である脂質。

・上記の脂質の生産方法によって生産された脂質であって、該脂質を構成する全脂肪酸に占めるアラキドン酸の割合が10%以上で、かつ該脂質を構成する全脂肪酸に占める超長鎖飽和脂肪酸の割合が0. 1%以下である脂質。

[0097] 以下実施例を示し、本発明の実施の形態についてさらに詳しく説明する。もちろん、本発明は以下の実施例に限定されるものではなく、細部については様々な態様が可能であることはいうまでもない。さらに、本発明は上述した実施形態に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、それぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせて得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。

[実施例]

(実施例A) MAELO遺伝子の機能解析

MAELO遺伝子を酵母で発現させるためのプラスミドを以下のとおり作製した。

[0098] M.alpinaをGY培地(2%グルコース、1%酵母エキス、pH6. 0に調製)で5日間培養し、RNeasy plant mini kit(QIAGEN)を用いて全RNAを抽出した。1 μ gの全RNAをSuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR(Invitrogen)を用いて、oligo-dTプライマーを用いて逆転写反応を行い、cDNAを合成した。合成されたcDNAのうち、1 μ gを鋳型としてプライマーMAELO-H1とプライマーMAELO-S1とExTaq(タカラバイオ)を用いてPCRを行った。得られたPCR産物を制限酵素HindIIIと制限酵素SpeIで消化し約950bpのDNA断片を、制限酵素HindIIIと制限酵素XbaIで消化したベクターpYES2(Invitrogen)に連結し、プラスミドpY2MELを構築した。

[0099] MAELO-H1: 5'-gcaagcttatggccgccgcaatcttggac-3' (配列番号15)

MAELO-S1: 5'-gcactagtttagatgtgcttgctgttgag-3' (配列番号16)

プラスミドpY2MELにより、S.cerevisiae INVSc1株を形質転換し、ウラシルを含まないプレート(グルコース2%、Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids and Ammonium Sulfate (Difco社製)0. 17%、硫酸アンモニウム0. 5%、ヒスチジン 20mg/1、ロイシ

ン60mg/1、トリプトファン40mg/1、Bacto agar2%) 上で生育してきた株を形質転換株として選択した。形質転換株を、ラフィノース2%、Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids and Ammonium Sulfate (Difco社製)0.17%、硫酸アンモニウム0.5%、タージトール タイプNP-40 1%、ヒスチジン 20mg/1、ロイシン60mg/1、トリプトファン40mg/1、ステアリン酸(18:0) 0.05%を含む培地に1白金耳植菌し、6時間振とう培養した。つづいてプラスミドpY2MEL上でGAL1プロモーター下流に連結されたMAELO遺伝子の発現を誘導するために2%(W/V)がラクトースを加えて、さらに28℃にて42時間振とう培養した。遠心分離により菌体を集め、凍結乾燥した後、塩酸メタノール法により菌体内の脂肪酸残基をメチルエステルに誘導した後、ヘキサンで抽出し、ヘキサンを留去したのち得られる脂肪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィーで分析した。培養液あたりの超長鎖飽和脂肪酸の生成量を表に示す。

[0100] [表1]

	超長鎖飽和脂肪酸の生成量 (mg / l)			
	20 : 0	22 : 0	24 : 0	26 : 0
pYES2 導入株	0.78	0.06	0.06	0.65
pY2MEL 導入株	0.63	0.12	0.34	1.4

[0101] 上記表1に示すように、pY2MEL導入株では、対照であるpYES2導入株と比べて、超長鎖飽和脂肪酸である22:0、24:0、26:0増加していた。この結果から、MAELO遺伝子は超長鎖飽和脂肪酸の鎖長延長活性を有することが示唆された。

[0102] (実施例B) MAELO遺伝子の発現抑制株の育種

MAELO遺伝子的一部分に対応する2本鎖RNAを過剰発現させるためのプラスミドを以下のとおり構築した。

[0103] プラスミドpBluescriptISK+を制限酵素SpeIとBamHIとで消化し、DNA blunting Kit (タカラバイオ)を用いて末端を平滑化した後、セルフライゲーションにより、プラスミドpBluescriptISK+(BamHI-)を構築した。次に、プラスミドpD4(文献:D. A. Mackenzie et al. Appl. Environ. Microbiol., 66, 4655-4664, 2000)を鋳型として、プライマーHisProFXとプライマーTrpCRXにより、LA Taq(タカラバイオ)を用いてPCRを行った

。反応条件は、94℃ 1分、55℃ 1分、72℃ 2分、を1サイクルとして、30サイクル行った。増幅されたDNA断片を制限酵素EcoRIで消化し、得られたDNA断片をプラスミドpBluescriptIISK+(BamHI-)のEcoRIサイトに挿入することにより、プラスミドpBlueHptを構築した。

[0104] HisProFX;5'-tacgaattcaagcgaaagagagattatgaa-3' (配列番号1)

TrpCRX;5'-gaagaattccctctaaacaagtgtacctgt-3' (配列番号2)

M. alpina をGY液体培地(2%グルコース、1%酵母エキス、pH6.0に調整)にて、28℃で5日間培養し、得られた菌体から文献(E. Sakuradani et al. Eur J. Biochem., 260, 208-216, 1999)の記載の方法に従い、ゲノムDNAを調整した。

[0105] M. alpina のゲノムDNAを鋳型として、プライマーMAELORNAi1-1とプライマーMAELORNAi3-1とで、LA Taq(タカラバイオ)を用いてPCRを行った。反応条件は、94℃ 1分、55℃ 1分、72℃ 1分を1サイクルとして、30サイクル行った。こうして増幅された約0.9kbのDNA断片をベクターpTBlueT-Vector(タカラバイオ)にTAクローニングした。塩基配列を確認した後、制限酵素NcoIとBamHIとで消化し、得られた約0.9kbのDNA断片をプラスミドpBlueHptのNcoI-BamHIサイトに挿入し、プラスミドpBlueMEi3を構築した。

[0106] MAELORNAi1-1;5'-ctggatcctatggccgccgcaatcttgaca-3' (配列番号3)

MAELORNAi3-1;5'-aaccatggatccctaggtggaagtaatg-3' (配列番号4)

M. alpina のゲノムDNAを鋳型として、プライマーMAELORNAi1とプライマーMAELORNAi5とで、LA Taq(タカラバイオ)を用いてPCRを行った。反応条件は、94℃ 1分、55℃ 1分、72℃ 1分を1サイクルとして、30サイクル行った。こうして増幅された約0.7kbのDNA断片をベクターpTBlueT-Vector(タカラバイオ)にTAクローニングした。塩基配列を確認した後、制限酵素NcoIとBlnIとで消化し、得られた約0.7kbのDNA断片をプラスミドpBlueMEi3のNcoI-BlnIサイトに挿入し、プラスミドpBlueMEi5を構築した。

[0107] MAELORNAi1;5'-ttggatccatggccgccgcaatcttgaca-3' (配列番号5)

MAERORNAi5;5'-tgatctcctaggtggaacactgatagccac-3' (配列番号6)

プラスミドpBlueMEi5を制限酵素EcoRIで消化して得られた約3.3kbの断片をプラ

スミドpDuraのEcoRIサイトに挿入し、プラスミドpDura5MEi51を構築した。

- [0108] M.alpinaのゲノムDNAを鋳型として、プライマーMAELORNAi1-1とプライマーMAELORNAi2で、LA Taq(タカラバイオ)を用いてPCRを行った。PCRは、94℃ 1分、55℃ 1分、72℃ 1分を1サイクルとして、30サイクルの反応を行った。こうして増幅された約0.7kbのDNA断片をベクターpT7Blue T-Vector(タカラバイオ)にTAクローニングした。塩基配列を確認したあと、制限酵素NcoIとBamHIで消化し、得られた約0.7kbのDNA断片をプラスミドpBlueHptのNcoI-BamHIサイトに挿入し、プラスミドpBlueMEi2を構築した。

- [0109] MAELORNAi2; 5'-tgccatggggaaatatgccctaggccatgc-3' (配列番号17)

次に、M.alpinaのゲノムDNAを鋳型として、プライマーMAELORNAi1とプライマーMAELORNAi4で、LA Taq(タカラバイオ)を用いてPCRを行った。PCRは、94℃ 1分、55℃ 1分、72℃ 1分を1サイクルとして、30サイクルの反応を行った。こうして増幅された約0.5kbのDNA断片をベクターpT7Blue T-Vector(タカラバイオ)にTAクローニングした。塩基配列を確認したあと、制限酵素NcoIとBlnIで消化し、得られた約0.7kbのDNA断片をプラスミドpBlueMEi2のNcoI-BlnIサイトに挿入し、プラスミドpBlueMEi4を構築した。

- [0110] MAELORNAi4; 5'-cacttacctaggggcttcttcttgagg-3' (配列番号18)

プラスミドpBlueMEi4を制限酵素EcoRIで消化して得られた約2.9kbの断片をプラスミドpDura5のEcoRIサイトに挿入し、プラスミドpDura5Mei41を構築した。プラスミドpDura5Mei51では約700bp、プラスミドpDura5Mei41では約500bpのMAELO遺伝子に対応する2本鎖RNAを過剰発現させることが可能である。

- [0111] プラスミドpDura5MEi51またはプラスミドpDura5Mei41により、M. alpina Δ ura-1株(Δ ura5)を宿主として、パーティクルデリバリー法で形質転換を行った。形質転換株の選択には、SC寒天培地(Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids and Ammonium Sulfate (Difco社製)5.0g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.7g、グルコース 20g、アデニン 20mg、チロシン 30mg、メチオニン 1.0mg、アルギニン 2.0mg、ヒスチジン 2.0mg、リジン 4.0mg、トリプトファン 4.0mg、スレオニン 5.0mg、イソロイシン 6.0mg、ロイシン 6.0mg、フェニルアラニン 6.0mg、寒天 20g/リットル)を用いた。

[0112] それぞれ数十株得られた形質転換株をGY培地に植え継ぎ、マーカー遺伝子であるura5遺伝子を安定に保持している株を2株ずつ選択した。なお、pDura5Mei51による形質転換株としては#1および#2を、pDura5Mei41による形質転換株としては#3および#4を用いた。#1および#2は約700bpの、#3および#4は約500bpのMAELO遺伝子に対応する2本鎖RNAをそれぞれ発現させる株である。これら#1～#4の形質転換株について、遺伝子が導入されているか否かをPCRにて確認した。すなわち、それぞれの形質転換株よりゲノムDNAを調製し、これを鋳型として次に示すプライマーRDNA1およびプライマーRDNA2とEX Taq (タカラバイオ)を用いてPCRを行った。このときの反応条件は、94℃ 1分、54℃ 1分、72℃ 1分を1サイクルとして、35サイクル行った。その結果、宿主とした Δ ura-1株ではDNA断片の増幅が認められなかったのに対して、形質転換株#1～#4ではいずれも約1.5kbのDNA断片の増幅が確認された。このことから、上記形質転換株#1～#4の18SrDNA領域でプラスミドpDura5MEi51またはpDura5Mei41と組換えが生じてDNA断片が導入されていることが確認できた。

[0113] プライマーRDNA1; 5'-acaggtacacttggttagag-3' (配列番号7)

プライマーRDNA2; 5'-cgctgcgttcttcacgatg-3' (配列番号8)

上記形質転換株を、GY液体培地10mlを入れた試験管に植菌し、28℃で12日間振とう培養し、ろ過により集菌した。

[0114] 菌体の一部をとり、RNeasy plant mini kit (QIAGEN)を用いて全RNAを抽出した。1 μ gの全RNAをSuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen)を用いて、ランダムヘキサマーをプライマーとして逆転写反応を行い、cDNAを合成した。合成されたcDNAのうち、1 μ lを鋳型として、プライマーMAELO-1とプライマーMAELO-2とEX Taq (タカラバイオ)を用いてPCRを行った。このときの反応条件は、94℃ 1分、55℃ 1分、72℃ 1分を1サイクルとして、20サイクル行った。

[0115] プライマーMAELO-1; 5'-agtccatcgactccttcgtcttcca-3' (配列番号9)

プライマーMAELO-2; 5'-cggtgtcagccaactcccagtactt-3' (配列番号10)

得られたPCR産物を電気泳動し、約340bpのフラグメントのバンドについて蛍光強度を比較した。その結果、宿主とした Δ ura-1株では明確なバンドが確認できたのに

対して、形質転換株 # 1 ~ # 4 ではいずれもバンドを確認することができなかった。このことから、形質転換株 # 1 ~ # 4 では MAELO 遺伝子の mRNA の発現が抑制されていることが確認できた。残りの菌体を乾燥し、塩酸メタノール法により菌体内の脂肪酸残基をメチルエステルに誘導した後、ヘキサンで抽出し、ヘキサンを留去したのち得られる脂肪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィーで分析した。その結果を下記表 2 に示す。

[0116] [表 2]

	対 照	形 質 転 換 株			
	$\Delta ura-1$	# 1 株	# 2 株	# 3 株	# 4 株
総 脂 肪 酸 中 の 割 合 (%)					
γ -リノレン酸	4. 2	4. 9	4. 3	3. 7	3. 3
ジホモ γ -リノレン酸	3. 0	2. 8	2. 7	3. 0	2. 9
アラキドン酸	23. 2	22. 6	26. 7	25. 1	25. 2
22:0	1. 3	0. 0	0. 0	0. 6	0. 6
24:0	3. 4	0. 1	0. 1	0. 3	0. 3
26:0	0. 0	0. 0	0. 0	0. 0	0. 0

[0117] その結果、上記表 2 に示すように、形質転換株の超長鎖飽和脂肪酸の割合は著しく低下していた。具体的には、# 1、# 2 の超長鎖飽和脂肪酸の生成はほぼ完全に抑制され、# 3、# 4 の超長鎖飽和脂肪酸の生成は一部抑制された。

[0118] (実施例 C) $\Delta 12$ 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子の発現抑制株の育種

$\Delta 12$ 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子の一部分に対応する 2 本鎖 RNA を過剰発現させるために以下のベクターを構築した。

[0119] プラスミド pMOD10 (Eur. J. Biochem. 261, 812-820 (1999)) を鋳型として、プライマ

ー $\Delta 12-1$ とプライマー $\Delta 12-2$ およびLA Taq(タカラバイオ)を用いてPCRを行い、約670bpのDNA断片を増幅した。このときの反応条件は、94℃ 1分、55℃ 1分、72℃ 1分を1サイクルとして30サイクル行った。

[0120] プライマー $\Delta 12-1$; 5'-gcggatccatggcacctcccaacacta-3' (配列番号11)

プライマー $\Delta 12-2$; 5'-agaggccttcataataaggtacgcaggc-3' (配列番号12)

増幅されたDNA断片を制限酵素BamHIおよびStuIにて消化し、プラスミドpMOD10をBamHIおよびMscIで消化して得られた約3.7kbの断片とligation high(東洋紡)を用いて連結し、プラスミドpB $\Delta 12$ RNAiを得た。続いて、プラスミドpB $\Delta 12$ RNAiを制限酵素EcoRIで消化し、DNA blunting kit(タカラバイオ)を用いて末端を平滑化した後、制限酵素BamHIで消化して約1.1kbの断片を得た。一方、プラスミドpBlueHptを制限酵素NcoIで消化し、DNA blunting kit(タカラバイオ)を用いて末端を平滑化した後、制限酵素BamHIで消化して約4.7kbのDNA断片を得た。これら2つの断片をligation high(東洋紡)を用いて連結し、プラスミドpBlue $\Delta 12$ RNAiを得た。これを制限酵素EcoRIで消化して得られた2.8kbのDNA断片をプラスミドpDura5のEcoRIサイトに挿入することによってプラスミドpDura5 $\Delta 12$ RNAiを得た。

[0121] プラスミドpDura5 $\Delta 12$ RNAiにより、*M. alpina* Δ ura-1株をパーティクルデリバリー法により形質転換した。形質転換株の選択は、SC寒天培地で行い、生育できる株を形質転換株とした。数十株得られた形質転換株をGY培地に植え継ぎ、マーカー遺伝子であるura5遺伝子を安定に保持している株を選択した。このようにして選択した株のうち3株(形質転換株#5～#7)について、導入したプラスミドpDura5 $\Delta 12$ RNAiが染色体上の18SrDNA領域との組換えにより染色体上に挿入されていることは、上記実施例Aと同様に確認した。形質転換株SC液体培地500mlを入れたフラスコで、28℃で5日間培養した。なお、対照の宿主 Δ ura-1株の培養には、SC液体培地にウラシル(50mg/リットル)を加えた。

[0122] 得られた菌体の一部より、上記実施例Aと同様の方法でcDNAを合成し、プライマー $\Delta 12-3$ とプライマー $\Delta 12-4$ とEx Taq(タカラバイオ)を用いてPCRを行った。このときの反応条件は94℃ 1分、55℃ 1分、72℃ 1分を1サイクルとし、20サイクル行った。

[0123] プライマー $\Delta 12-3$; 5'-ttgctattgatctgacctgggcctc-3' (配列番号13)

プライマー $\Delta 12-4$; 5'-tggaacaaagacctggctccttgg-3' (配列番号14)

得られたPCR産物を電気泳動し、約310bpのフラグメントのバンドについて蛍光強度を比較した。その結果、宿主として $\Delta ura-1$ 株では明確なバンドが確認できたのに対して、形質転換株 #5～#7ではいずれもバンドを確認することができなかった。このことから、形質転換株 #5～#7では、 $\Delta 12$ 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子のmRNAの発現が抑制されていることが確認できた。

[0124] また、菌体の脂肪酸分析を上記実施例Aと同様に行った。その結果を下記表3に示す。

[0125] [表3]

	対 照	形 質 転 換 株		
	$\Delta ura-1$	#5株	#6株	#7株
総脂肪酸中の割合(%)				
$\omega 6$ 系PUFA				
リノール酸	14.8	0.1	0.0	0.1
γ -リノレン酸	3.4	0.2	0.0	0.5
ジホモ γ -リノレン酸	2.4	0.2	0.2	0.1
アラキドン酸	11.9	1.5	1.1	2.3
$\omega 6$ 脂肪酸合計	32.5	2.0	1.3	3.0
$\omega 9$ 系PUFA				
18:2 $\omega 9$	0.2	6.3	6.9	5.9
20:2 $\omega 9$	0.0	0.9	0.9	0.8
ミード酸	0.0	1.6	1.6	1.3
$\omega 9$ 脂肪酸合計	0.2	8.8	9.4	8.0

[0126] 表3から明らかなように、形質転換株では $\omega 6$ 系PUFAの割合が低下し、 $\omega 9$ 系PU

FAの割合が著しく上昇していることが確認できた。特に、ミード酸については、 Δ ura-1株には全く存在しなかったが、形質転換株にはかなりの量が蓄積されていた。すなわち、 Δ 12脂肪酸不飽和化酵素遺伝子の発現を抑制することにより、ミード酸をはじめとする ω 9系PUFAの生産能を持たせることができることがわかった。

産業上の利用の可能性

- [0127] 本発明に係る脂質生産菌の育種方法によれば、特定の遺伝子の発現が抑制された、モルティエラ属に属する脂質生産菌の変異株を取得することができる。すなわち、モルティエラ属に属する脂質生産菌を原種として、所望の性質を有する新規品種(新規株)を効率的かつ有効に生産することが可能となるという効果を奏する。
- [0128] また、本発明では、セルフクローニングも可能となるため、原種のモルティエラ属の菌から適当なDNA断片を取得し、RNAi法を実施することにより、特定の遺伝子の発現を抑制することが可能となり、脂質生産量の増加、生産できる脂質の種類の改変、脂質組成の改変等が可能な形質転換株(形質転換体)すなわち新規株を得ることができるという効果を奏する。
- [0129] モルティエラ属の菌は脂質生産菌としてよく知られており、*M. alpina* のように信頼性の高いものも含まれている。それゆえ、本発明を用いれば、例えば、脂質生産性をより一層高めた株や、脂質組成を変化させた株、特定の脂質の生産を高めた株などを容易かつ効率的に生産することができる等の効果を奏する。
- [0130] 以上のように、本発明にかかる脂質生産菌の育種方法は、モルティエラ属に属する脂質生産菌を効率的かつ有効に育種することができる。それゆえ、本発明は、モルティエラ属の菌類を利用する各種醗酵技術に関わる産業や、当該醗酵技術を用いた食品産業、医薬品産業等に利用することが可能である。

請求の範囲

- [1] モルティエレラ (Mortierella) 属に属する脂質生産菌の育種方法であって、
上記脂質生産菌における特定の遺伝子の発現を抑制する発現抑制工程を含むことを特徴とする脂質生産菌の育種方法。
- [2] 上記発現抑制工程は、特定の遺伝子の発現をRNAi法により抑制するRNAi工程を含むことを特徴とする請求項1に記載の脂質生産菌の育種方法。
- [3] 上記RNAi工程は、上記脂質生産菌に、上記特定の遺伝子が有する塩基配列の全体または一部に対応する2本鎖RNAを発現する組換え発現ベクターを導入する形質転換工程を含むことを特徴とする請求項2に記載の脂質生産菌の育種方法。
- [4] 上記RNAi工程は、さらに、上記組換え発現ベクターを構築する発現ベクター構築工程を含むことを特徴とする請求項3に記載の脂質生産菌の育種方法。
- [5] 上記形質転換工程では、エレクトロポレーション法、またはパーティクルデリバリー法が用いられることを特徴とする請求項3または4に記載の脂質生産菌の育種方法。
- [6] 上記脂質生産菌は、モルティエレラ アルピナ (Mortierella alpina) であることを特徴とする請求項1～5のいずれか1項に記載の脂質生産菌の育種方法。
- [7] 上記特定の遺伝子は、脂質代謝遺伝子であることを特徴とする請求項1～6のいずれか1項に記載の脂質生産菌の育種方法。
- [8] 上記脂質代謝遺伝子は、脂肪酸代謝遺伝子であることを特徴とする請求項7に記載の脂質生産菌の育種方法。
- [9] 上記脂肪酸代謝遺伝子は、脂肪酸鎖長延長酵素または脂肪酸不飽和化酵素をコードする遺伝子であることを特徴とする請求項8に記載の脂質生産菌の育種方法。
- [10] 上記脂肪酸鎖長延長酵素をコードする遺伝子は、GLELO遺伝子またはMAELO遺伝子であることを特徴とする請求項9に記載の脂質生産菌の育種方法。
- [11] 上記脂肪酸不飽和化酵素をコードする遺伝子は、 $\Delta 5$ 脂肪酸不飽和化酵素、 $\Delta 6$ 脂肪酸不飽和化酵素、 $\Delta 8$ 脂肪酸不飽和化酵素、 $\Delta 9$ 脂肪酸不飽和化酵素、 $\Delta 12$ 脂肪酸不飽和化酵素、 $\Delta 15$ 脂肪酸不飽和化酵素、 $\Delta 17$ 脂肪酸不飽和化酵素、 $\omega 3$ 脂肪酸不飽和化酵素から選ばれる1つの酵素をコード遺伝子であることを特徴とする請求項9に記載の脂質生産菌の育種方法。

- [12] 請求項1～11のいずれか1項に記載の脂質生産菌の育種方法を実施するための育種キット。
- [13] 上記育種キットは、以下の(a)～(d)のうち、少なくとも1つの物質を含むことを特徴とする請求項12に記載の育種キット。
- (a) 上記特定の遺伝子が有する塩基配列の全体または一部に相当する2本鎖RNAを発現する組換え発現ベクター。
- (b) (a)の組換え発現ベクターを構築するための試薬類。
- (c) (a)の組換え発現ベクターを脂質生産菌に導入するための試薬類。
- (d) 脂質生産菌及び／又は(a)の組換え発現ベクターが導入された形質転換株を培養するための試薬類。
- [14] 請求項1～13のいずれか1項に記載の脂質生産菌の育種方法または育種キットによって得られることを特徴とする脂質生産菌。
- [15] 請求項14に記載の脂質生産菌からPUFA含有脂質を生産することを特徴とする脂質の生産方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005786

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/09, 15/88, 1/15, C12P7/64

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/00-15/90, 1/15, C12P7/64

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2005	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), WPIDS (STN), PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	Sho SHIMIZU et al., "Mortierella alpine 1S-4 Oyobi Sono Hen'i Kabu ni yoru Kodo Fuhowa Shibosan Gan'yu Yushi no Seisan", Yukagaku (1993), Vol.42, No.4, pages 254 to 264; page 257, '4. M.alpina 1S-4 yori Yudosareta Fuhowaka Koso Kesson Hen'i Kabu', Fig. 3	1-9, 11-15/ 10
Y	PARKER-BARNES. JM. et al., Identification and characterization of an enzyme involved in the elongation of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids., Proc.Natl.Acad.Sci.USA.(2000), Vol.97, pages 8284 to 8289	10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 April, 2005 (19.04.05)

Date of mailing of the international search report

10 May, 2005 (10.05.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005786

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KADOTANI N. et al., RNA Silencing in the phytopathogenic fungus Magnaporthe oryzae., Mol.Plant.Microbe Interact. (2003), Vol.16, No.9, pages 769 to 776	2-5

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int.Cl.⁷ C12N15/09, 15/88, 1/15, C12P7/64

B. 調査を行った分野
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int.Cl.⁷ C12N15/00-15/90, 1/15, C12P7/64

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
CA (STN), WPIDS (STN), PubMed

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	清水昌他、「Mortierella alpine 1S-4 及びその変異株による高度不飽和脂肪酸含有油脂の生産」 油化学 (1993), Vol. 42, No. 4, p. 254-264 第 257 頁「4. M. alpina 1S-4 より誘導された不飽和化酵素欠損変異株」及び Fig. 3 など参照	1-9, 11-15/ 10

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」国際出願日 又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	

国際調査を完了した日 19.04.2005	国際調査報告の発送日 10.5.2005
--------------------------	-------------------------

国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号	特許庁審査官 (権限のある職員) 佐久 敬 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 3037
---	---	------------

様式PCT/ISA/210 (第2ページの続き) (2004年1月)